DI	ALOGV Gujded Sear	VEB.	) 	search favorites	settings cost to	goff ti	
Dynamic Seam Records fo			of Japan		, save sa alori		eare strategy only
Output 😌	For	mat: Full Re	ecord	Destinatio	Browser	arch	display/send
select all none	Records	1 of	1 In 1	full Format			

<sub>7 1.</sub> 1/19/1

03832082 \*\*Image available\*\*

DNA CODING ALKALINE PROTEASE YA ENZYME AND PRODUCTION OF ALKALINE F THE DNA

Pub. No.: 04-197182 [JP 4197182 A] Published: July 16, 1992 (19920716)

Inventor: TOBE SEIICHI

**ODERA MOTOYASU** 

**ASAI YOSHIO** 

Applicant: LION CORP [000676] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 02-327110 [JP 90327110]

Filed: November 28, 1990 (19901128)

INTL CLASS: International Class: 5 ] C12N-015/57; C11D-003/386; C12N-009/54; C12I

C12N-009/54; C12R-001/07

JAPIO Class: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 14.1 (ORGANIC C

Compounds); 14.6 (ORGANIC CHEMISTRY -- Liquid Fuel, Oils & Fats)

Journal: Section: C, Section No. 1000, Vol. 16, No. 524, Pg. 33, October 28, 1992 (1992102

### **ABSTRACT**

NEW MATERIAL: DNA coding alkaline protease Ya enzyme.

EXAMPLE: The DNA having the amino acid sequence of formula.

USE: Production of alkaline protease Ya, etc.

PREPARATION: The DNA can be produced by gene recombination technique.

1

AsnAspValAlaArgGlylleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsmTyr

21

GlyClnGiyGinLeuVaiAlaVaiAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArg

SerMetHisGluAlaPheArgGlyLysileThrAlaLeuTyrAlaLeuGiy

AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisYalAlaGlySerValleu

LeuAsnLysGlyMetAlaProGinAlaAsnLeuValPheGlnSerfleMet 101

GlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAla

GlyAlaArglleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyr

401

YalPhelleAsnAlaProGinSerG|yThrTyrileHeGluValGinAla 421 433

ProSerGlyProGinArgPheSerLeuAlalleValHis

©1997-1999 The Dialog Corporation ~

### ⑲ 日本国特許庁(JP)

① 特許出願公開

### ® 公開特許公報(A) 平4-197182

⑤Int.Cl. 5	識別記号	庁内整理番号	④公開	平成 4 年(1992	)7月16日
C 12 N 15/57 C 11 D 3/386 C 12 N 9/54 C 12 N 15/57 C 12 R 1:07) (C 12 N 9/54 C 12 R 1:07)	ZNA	7614-4H 7823-4B			
0 12 11 11.917		8717-4B C 審査詞	12 N 15/00 青求 未請求 請	青求項の数 9	A (全17頁)

❷発明の名称 アルカリプロテアーゼYa酵素をコードするDNA及び該DNAを

用いたアルカリプロテアーゼYaの製造方法

②特 顯 平2-327110

⊜出 願 平 2 (1990)11月28日

②発 明 者 戸 部 聖 一 神奈川県中郡二宮町山西457
 ②発 明 者 大 寺 基 靖 神奈川県平塚市日向岡 2 - 2 - 34
 ②発 明 者 浅 井 芳 男 神奈川県中郡二宮町百合が丘 2 - 23 - 3
 ③出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号
 ③代 理 人 弁理士 中 村 稔 外8名

### 明 紀 書

1.発明の名称 アルカリプロテアーゼ Y a 酵素

をコードするDNA及び該DN

Aを用いたアルカリプロテァー

ゼYaの製造方法

### 2.特許請求の範囲

1

- (1) アルカリプロテアーゼ Y a 酵素をコードする D N A。
- (2) 下記のアミノ酸配列で特定される請求項1記 載のDNA。

AsnAspValAlaArgGlylleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyr
21 40
GlyGlnGlyGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArgAsnAspSer
41 60
SerMetHisGluAlaPheArgGlyLyslieThrAlaLeuTyrAlaLeuGlyArgThrAsn
61 80
AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlySerValLeuGlyAsnAla
81 100
LeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerlleMetAspSerSer
101
GlyGlyLeuGlyClyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAlaTrpAsnAla
121 140
GlyAlaArgileHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTvrThrAlaAsn

141 160	0
SerArgGinValAspGluTyrValArgAsnAsnAspMetThrValLeuPheAlaAlaGl	У
161	0
AsnGluGlyProAsnSerGlyThrlleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlalleTh	r
181 200	0
ValGlyAlaThrGluAsnTyrArgProSerPheGlySer!leAlaAspAsnProAsnHi	s
201 220	0
lleAlaGinPheSerSerArgGiyAlaThrArgAspGiyArgileLysProAspValTh	٢
221 240	0
AlaProGlyThrPhelleLeuSerAlaArgSerSerLeuAlaProAspSerSerPheTra	p
241 260	0
${\tt AlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThrProlleVa}$	1
261 280	0
AlaGlyAsnValAlaGinLeuArgGiuHisPhelleLysAsnArgGlyIleThrProLys	s
281 300	0
ProSerLeulleLysAlaAlaLeulleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeuGlyTyrPro	0
301	
SerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyrVa	1
321	
AsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAl	2
341 36	
GlyLysProleuLyslleSerLeuValTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSe	r
361 38	
TyrThrLeuYalAsnAspleuAspLeuVallleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrVa	. I
381 40	
GlyAsnAspPheSerTyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAs	n

20

401 420

ValPhelleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrflefleGluValGlnAlaTyrAsnVal
421 433

ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlalleValHis

(3) 下記のDNA配列で特定される請求項!記載

ODNA.

1 60
AATGATGTAGCAAGAGGGATAGTAAAAAGCTGATGTTGCACAAAACAATTACGGATTATAT
61 120
GGACAAGGTCAACTAGTTGCAGTAGCGGACACAGGCTTAGATACAGGTCGTAACGATAGT
121 180
TCTATGCATGAAGCATTCCGGCGGGAAAATCACAGGCTCTTTACGCGTTAGGAAGAACTAAT
181 240
AATGCGAGTGATCCGAATGGGCATGGCACACATGTAGCAGGTTCTGTACTTGGTAATGCT
241 300
TTAAATAAAGGAATGGCTCCGCAAGCTAACTTAGTCTTCCAATCTATTATGGATACCAGC
301 360
GGAGGATTAGGTGGCTTACCATCGAACTTAAATACGTTATTTAGTCAAGCTTGGAATGCT
361 420
GGAGCAAGAATTCATACTAACTCTTGGGGAGCCCCAGTAAATGGAGCGTACACTGCTAAC
421 480
TCGAGGACAAGTGGATGAGTATGTTCGAAATAATGATATGACGGGTACATTTTTGCAGCTGGT
481 540
AATGAAGGTCCTAATTCAGGGAACAATTAGTGCTCCAGGTACAGCGGAAAAATGCTATTACG

- (4) 請求項1又は2のDNAの上流に、中性また はアルカリプロテアーゼ遺伝子の転写及び翻訳 に関する5′末端の非翻訳領域又はアミラーゼ 遺伝子の転写及び翻訳に関する5′末端の非翻 訳領域を有する請求項1記載のDNA。
- (5) 請求項1~4のいずれか1項に記載のアルカリプロテアーゼYa酵素をコードするDNAを含有するプラスミドDNA。
- (6) 請求項5記載のプラスミドDNAを導入した 微生物。
- (7) 微生物がバチルス属細菌である請求項 6 記載の微生物。
- (8) 請求項 6 又は 7 記載の微生物を培養することにより培養物からアルカリプロテアーゼ Y a を採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼ Y a の製造方法。
- (9) 数生物がバチルス属細菌であり、中性で培養する請求項 8 記載の製造方法。

541 500
GTCGGCGCAACGGAAAACTATCGCCCAAGCTTCGGTTCGATAGCAGATAACCCAAATCAT
660
ATTGCACAATTTTCATCGAGAGGAGCTACGAGGGATGGACGAATTAAGCCTGACGTAACA
661 720
GCTCCTGGAACATTTATTTATCAGCACGTTCTTCCTTAGCTCCAGACTCTTCGTTTTGG
721 780
GCGAATTATAACAGTAAATACGGGTATATGGGGGGGTACCTCCATGGCGACACCTATTGTT
781 840
GCAGGGAATGTCGCGCAATTACGTGAGCATTTTATAAAAAATAGAGGTATTACTCCTAAG
841 900
CCTTCTTTAATAAAGCTGCACTTATCGCTGGTGCTACTGATGTTGGTTTAGGATATCCT
901 960
ACTCGTGACCAAGGCTGGGGGCGTGTTACTCTAGATAAATCGTTAAATGTAGCGTATGTC
961 1020
AATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGACAAAAAGCAACGTATTCGTTCCAAGCACAAGCG
1021
GGTAAACCTTTAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGCTCCTGGAAGTACAACTGCATCT
1081 1140
TATACACTAGTTAATGATTTAGATCTAGTTATTACTGCTCCGAATGGACAAAAATATGTA
1141 1200
GGAAATGATTTTAGTTATCCTTATGATAATAACTGGGATGGTCGCAACAATGTTGAGAAC
1201 1260
GTATTTATAAACGCTCCGCAATCTGGAACGTATATAATTGAGGTTCAAGCGTATAATGTA
1261 1299
CCATCTGGCCCACAGCGTTTCTCACTAGCTATCGTACAT

### 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れ、洗浄力の改善に寄与しうるYa酵素(特開昭61-280278号)の遺伝子をコードするDNA断片及び該断片を含むプラスミドを導入した微生物を用いてYa酵素を製造する方法に関する。 〔従来の技術〕

耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れたYa 酵素は、通常のアルカリプロテアーゼが失活する ような高門液体洗浄剤に配合した場合でも、蛋白 質分解活性を保持し、洗浄力の向上に寄与する能力を有している。Ya酵素は、バテルス・エスピー Y株(Bacillus sp. Y)(微工研菌寄第8088号) を培養することにより、その培養物中に見いだすことができるが、通常の培養を行なってもその生産量は低くこの状態では工業的レベルでの計算は 困難と言わざるをえない。

一般に、バチルス属が生産するアルカリプロテ アーゼの生産性を向上させるためには、化学物質、 紫外線照射等による変異処理等を用いた選扶の脊種や培養条件の改良等を行ない、生産性を向上させることが試みられている。ところが菌株または製造物の種類によってその効果の程度は様々であり、偶然性によるところが大きい。そこで合理的かつ理論的に生産性の高まる製造方法、すなわち遺伝子組換え技術を用いたYa群素の製造方法が望まれている。

また好アルカリ性細菌であるバチルス・エスピー Y株は、アルカリ性の培地で培養を行なうために、栄養源の変質や培養液の着色等の様々な不都合が生じる。そのため中性付近での培養が可能になれば、培養工程や精製工程の簡略化が可能となり工業生産において有利である。

[発明が解決しようとする課題]

Ya酵素の生産性を高めるためには、バチルス・エスピーY株を用いた従来の変異処理法を主体とした育種法では不十分な点がある。そこで本発明は、遺伝子組換え技術を用いることによりYa 酵素の生産性の向上に利用できるYa酵素をコー

塩基配列とアミノ酸配列を有する。この配列中に は、転写、翻訳開始に関する領域、前駆体領域と 成熟蛋白領域とが含まれ、このうち、203残基 目~635残基目のアミノ酸配列が成熟タンパク 質に相当し、本発明において重要である。つまり、 本発明によれば上記203~635(成熟酵素領 域) 残基の上流に位置するプロモーター領域、分 巡のための領域等を公知の手段により他の蛋白質 をコードする遺伝子のそれらと置換し、より効率 的にYa酵素を製造することができる。この際、 本発明では、203~635残基の上流に位置す るプロモナター領域をバチルス属細菌で強力に機 能するようなプロモーター領域をもった遺伝子、 例えばパチルス属細菌由来の中性又はアルカリブ ロテアーゼ又はアミラーゼ遺伝子のプロモーター 領域で置換したDNAをプラスミドに導入し、こ れをパチルス属細菌に導入することによって、中 性領域(pH6~8近辺)で培養することによりY a酵素を効率的に製造することができる。

第1図に示す塩基配列は、Ya酵素遺伝子のク

ドする遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いてYa群素の生産性を向上させうる方法を提供することを目的とする。

[課題を解決するための手段]

本発明に係るYa酵素遺伝子は、第1図に示す

Ya酵素生産歯、例えばバチルス・エスピー Y株からYa酵素を精製し、必要に応じてトリプシン消化等により得られたYa酵素断片等を用いてアミノ酸配列を決定し、このうち好適なアミノ酸配列に対応する一本値オリゴヌクレオチドをDNAプローブとして合成することができる。

次に、Ya酵素生産歯より染色体DNAを抽出する。用いる歯株としてはYa酵素を生産する歯株であればいかなる歯株でも構わないが、例えばバチルス・エスピー Y株があげられる。染色体DNAを抽出する方法としてはサイトゥーミゥラ

の方法(Biochim、Biophs、Acta、7.2、6.1.9 (1.9.6.3))等によって顕製することができる。このように取得した染色体 D.N.A.をEcoR.I.、X ba.I などの制限酵素を用いて断片化し、アガロースゲル電気泳動に供し、合成した D.N.A.ブローブを用いてサザンハイブリダイゼーション(Molecular Cloning、2nd Edit、Cold Spring Harbor Laboratory Press、9.3.1 (1.9.8.9))を行ない、D.N.A.ブローブの相補性及びその相補するD.N.A.断片の大きさを特定する。染色体菌D.N.A.を消化する制限酵素は、他の制限酵素であっても構わない。D.N.A.ブローブはアージュアーA.T.P.を用いることによって標識することができる。

次に特定したDNA断片を回収する。回収方法はどのような方法でも構わないが、例えばDEAEペーパー法(Molecular Cloning 2 nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.24 (1989))を用いてそのDNA断片を回収することができる。

DNAを抽出し、前記と同様にサザンハイブリダイゼーションを行ない、DNAプローブと相補する組換えプラスミドを保持する菌株を選択することによりYa群業遺伝子を保持する形質転換株を取得することができる。

取得したYa酵素遺伝子の塩基配列はSangerらの方法等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74. 5463 (1977)) により決定することができる。さらにその塩基配列によってYa酵素のアミノ酸配列を解明することができる。

本発明のDNA配列は天然のDNA配列のみに 限定されるのではなく、本発明により明らかにさ れたYa群業のアミノ酸配列をコードする他の DNA配列も含まれる。また、本酵素の特徴であ る耐界面活性剤性及び耐アルカリ性等のYa群素 の機能を損なわない限りにおいて本発明のDNA 配列及びアミノ酸配列に人為的な挿入、欠失、置 換等を行なうことにより改造することは可能であ り、本発明にはそのような変異遺伝子及び改質酵 素蛋白質も含まれる。 さらに回収したDNA断片とベクターDNAとを連結する。そのDNA断片を消化した制限酵素 と同じ制限酵素認識部位を持つベクターDNA、例えばpBR328、pUC118などを同一のNAで 制限酵素で消化する。さらにアルカリフェスファ ターゼで脱燐酸したのち同一の制限酵素認識を を有するDNA断片とT4リガーゼにより運転することができる。この反応物をHanahanの方法 (DNAcloning Vol.1 TRL Press, p. 109 (1985))に進じて大腸密に導入することができる。

形質転換を行なった菌株の中からYa酵素遺伝子を保持する菌株を選択する。選択方法にはコロニーハイブリダイゼーション法(Molecular Cloning 2 nd Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.90(1989))等、様々な方法を用いることができるが、例えば形質転換を行なった各菌株よりアルカリーSDS法(Molecular Cloning 2 nd Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25(1989))を用いて

Ya酵素遺伝子を発現させるために、Ya酵素 遺伝子を適当な宿主菌に導入する。宿主菌として は、大腸菌、バチルス属、シュウドモナス (Pseudogonas)属等の細菌、アスペルギルス (Aspergillus)属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、キャンジダ (Candida)属等の微生物 があげられるが他の宿主菌でも構わない。例えば パチルス属を宿主菌とした場合、Ya酵素遺伝子 を分断することなく消化する制限酵素と同じ制限 酵素でベクタープラスミド、例えばpUB110、 pBD64等を消化し、これとYa酵素遺伝子を T4リガーゼを用いて連結させる。この反応物を プロトプラスト法(S. Chang, Mol. Gen. Genet. 168, 111 (1979)) を用いてバチルス 属細菌に導入することができる。Ya酵素遺伝子 を含む DNAを導入した宿主菌を培養し、その 培養物よりYa酵素を取得する。Ya酵素の発現 の確認及びその発現量はウエスタン・ブロッティ ング、蛋白質分解力の測定等により行なうことが できる。

Ya群素の生産性を増大させるためには、プロ モーター領域を宿主菌にとって効果のよいプロモ - ター領域と交換して発現させることにより、生 産性を増大させることができる。例えばパチルス 属細菌を宿主菌とした場合には、バチルス属細菌 由来の中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子の プロモーター領域、アミラーゼ遺伝子のプロモー ター領域等が好都合である。例えばYa酵素遺伝 子由来のプロモーター領域をバチルス・ライベン ホルミス(Bacillus licheniformis)由来のアミラ - ゼ遺伝子のプロモーター領域に交換する。 そし て、例えばプロモーター領域後方部分に部位特異 的変異法を用いて制限酵素認識部位、例えばBcll 認識部位等を作製し、制限酵素を用いたプロモー ター領域の切除及びT4 リガーゼを用いた連結等 を行なうことによりプロモーター領域の交換を行 なうことができる。さらにプロモーター領域の交 換を行なったYa酥素遺伝子をバチルス・サチル ス (Bacillus Subtilis) に導入し、培養を行な うことによりYa酵素を生産させる。これにより

もとのYa群素遺伝子由来のプロモーター領域を 用いた場合に比べて生産性を増大させることがで きる。

上記に示す手法によりプロモーター領域を交換したYa群素遺伝子を含むプラスミドを保持するバチルス・サチルスを用いてYa群素の極めて高い生産性を獲得することができる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔実施例〕

実施例 1

### <u>サザンハイブリダイ</u>ゼーション

Ya酵素のN末端領域のアミノ酸配列をアプライド・バイオ・システムズ社(ABI社)製プロテインシークエンサー377Aを用いて決定した。 結果は以下に示す通りであった。

N' -AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAla GlnAsnAsnTyrGly

Ya群素の中央部ないして未端領域のアミノ酸 配列を解析するため、トリプシン消化により得られた試料を用いて同様の操作を行なった。その結 果を以下に示す。

N' -LysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThr

これらの解析結果よりイノシン法に基いて以下 に示すまりゴヌクレオチドDNAをABI社製 DNA合成装置381Aを用いて作製した。

A A T

プローブN: 5' CCATA TT TT TGIGGIACATGIGG 3'

A T

 $\mathcal{I}$   $\square$  -  $\mathcal{I}$  C: 5' GTICCICCCATATAIGC TA TT 3'

G C

上記プローブについては、 r ー <sup>32</sup> P ー d A T P ( r マシャム社製) 及び T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ ( 宝酒造社製) を用いて 5 ′ 末端を <sup>32</sup> P で 標識した。

バチルス・エスピー Y株をNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>10g /1を含むブイヨン培地(極東製薬社製)200 配を含む坂口フラスコに植菌し、30℃で終夜方 養した。菌体的2gを取得し、サイトウーミウラ の方法に増じて染色体DNAを2.8 幅調製した。 このDNA10μgをEcoRI(制限酵素は大かったはXbaIで消化をプロースを用いて生気が動に供し、先に調製したプロースを用いてサザンハイブリダイゼーションを体をDNA断片では、約2.8 KbpのDNA断片ではでは、約2.8 KbpのDNA断片でイブリダイズした。さらに同様作をプローズした。さらに同様作をプローズした。さらに同様作をフロースを含むでは、10gを表表を含むませます。10gをNA断片ではではでは、10gをNA断片ではではではではできませます。10gをNamにはではではではではではできませます。10gをNamによるでは、10gをNamにはではできませます。10gをNamにはではできませます。10gをNamにはではできませます。10gをNamにはではできませませます。10gをNamにはできませます。10gをNamにはできませます。10gをNamには、10gをNamにはできませます。10gをNamには、10geのNamには、10geの いても行なったところ、EcoR I で消化した集色体 DNA 断片では約2.0 Kbp の DNA 断片が、また X ba I で消化した断片では約1.2 Kbp の DNA 断片がハイブリダイズした。

### クローニング

前述の英色は D N A 2 0 0 μg を E co R ! で消化後アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8 Kbp の D N A 断片を D E A E ペーパー法を用いて2 0 μg 回収した。また約2.0 Kbp の D N A 断片についても同様の操作を行ない2 0 μg 回収した。 Φ 色体 D N A 2 0 0 μg を X ba I で消化し同様の操作を行ない約1.2 Kbp の D N A 断片を 1 0 μg 回収した。 p B R 3 2 8 (ペーリンガー社製) 1 μg を E co R I で消化しアルカリフェスファターゼ (ペーリンガー社製) で脱燐酸 & 、フェノーゼ は、すなわちフェノールを行ない、違心分離後上によりを加える操作を行なった。 さらにエタノールを回収する投作を行なった。 さらにエタノールで (1 : 1) を加え 賃 変性を行なった。 さらにエタノールを回収する 5 0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) 及び 2 倍量のエタノールを加えー8 0

ライゲーションキットを用いて連結し、同様の提作をプローブNを用いて行なった。その結果プローブNとハイブリダイズするプラスミドpYX1 (第4図)を見いだし、そのブラスミドを保持する菌株を取得した。

### 塩基配列の決定

取得したプラスミドpYT101、pYB2及びpYX1のYa酵素遺伝子の一部をpUC 118及びpUC119(宝酒造社製)にサブクローニングし、宝酒造社製のマニュアルに従って1本館DNAを調製した。この1本館DNAとαー³3SーdCTP(Tマシャム社製>37TBq/mmo1)及びSEQUENASE(東洋紡社製)を用いて塩基配列の決定を行なった。この結果得られた塩基配列を第1図に示す。218bpから2122bpに存在するオープン・リーディングフレームより解明されたアミノ酸配列には、前述のYa酵果のが出まり確認されたアミノ酸配列と一致する配列が203酸基目からと448度基目からに見いだせる。ま

も10分給却後適心分離によりDNAを回収する 提作を行なった。このうち0.2 μgと前述の約 2.8 Kbp のEcoR 1 断片 O. O 5 μ g をライゲーシ ョンキット(宝酒造社製)を用いて連結した。こ の反応物をハナハンの方法に準じて大脇衛HB 101株に導入した。生育した形質転換体500 株よりアルカリーSDS法を用いてDNAを抽出 し、前記のプローブNを用いてサザンハイブリダ イゼーションを行なった。その結果プローブNと ハイブリダイズするプラスミド pYT101 (第2図)を見いだし、そのプラスミドを保持す る菌株を取得した。さらに約2 Kbp のEcoR I 断 片についても前述のプローブCを用いて同様の提 作を行ない、プローブCとハイブリダイズするプ ラスミドpYB2 (第3図) を見いだし、そのプ ラスミドを保持する菌株を取得した。また、p UC 118 (宝酒造社製) 1 µ g を X ba I で消化して ルカリフォスファターゼで脱燐酸後、フェノール 抽出、エタノール沈澱を行なった。このうち0.2 μgと前述の約1.2 Kbの X ba I 断片 0.0 5 μg を

た N 末端が 2 0 3 残基目から始まることから、翻訳開始から 2 0 2 残基目までが前駆体領域であり、2 0 3 残基目以降が成熟酵素を構成する領域と判断される。

### 実施例 2

### プロモーターの取得

し培地(バクトトリプトン10g/1、バクトイーストエキス5g/1、NaCl5g/1、バクトアガー20g/1、アンピシリン 10幅/1、バクトアガー20g/1、アンピシリン 10幅/1、 の は で 的 40時間 培養した。 その 結果形質 転換体 2000 株より、デンで を 分解する、即ちてミラーゼ 遺伝子を有する 密株 な保持する ブラス を とり TA1 (第5 図)のプロモーター領域 の 塩 屋 図 列を実施例1に準じて決定し、その 結果を第6 図 に示す。

### Ya酵素を発現しうるプラスミドの作製

プラスミドρYB2 50μgをEcoRI及びSphIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05μgと、あらかじめEcoRI、SphIで消化してルカリフォスファターゼを用いて脱燐酸処理後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収したりUC118 0.2μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に進じて大腸歯JM109株に導入した。生

に示すDNAプローブ (第1図の200-229 bpに対応) を合成し、

5′-TTTCCCCTTCATTGATCATCAACTCCTCAT -3′ 同様にして塩基配列を改変し、Ya酵素翻訳開始 コドン上流にBcl I 認識部位を作製したプラスミ ド p T B 3 E B を取得した。

また下記に示す D N A プローブを合成し、(第 6 図の 2 1 6 - 2 4 5 bpに対応)を合成し、

5′-TGTTGTTTCATGATCATCCTCCCCTTTCAA -3′ 同様にしてpTA1の塩基配列を改変し、プロモーター領域下流にBclI認識部位を持つプラスミ ドpTA1Bを作製した。

p U C 1 1 8 1 μgをE co R I で消化してルカリフェスファターゼで脱燐酸後、フェノール処理、エタノール沈澱を行ない回収した。このうち 0.2 μg とあらかじめ E co R I で消化し、フェノール処理、エタノール沈澱を行い回収した p U B 1 1 0 0.0 5 μg をライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に増じて大鍋第JM109株に導入した。生育した形

育した形質転換体の中から第7区に示す。PYT 101 50μgをEcoRIで消化しDEAEに示すのDNA断片を用いて約2.7 Kbp-のDNA断片を用いて約2.7 Kbp-のDNA断片を用いて約2.7 Kbp-のDNA断片を同いた。そのうち005μgと、タークールの方ち005μgと、タークールを開いた。こので脱行ない回収したpリフェス型理、エリンルのを同じて入りで表に単位に対した。このは数に対したので表に単位で表に対したがある。このでは数に対したのでは対したがある。このでは対したのでは対したのでは対した。を用いて大路関いて、生育した形質転換体を取得した。すりTB3を保持する菌株を取得した。

ABI社製DNA合成装置381A型を用いて下記に示すDNAプローブ(第1図の1181-1210bpに対応)を合成し、

5′-CCAAGAGTTAGTATGGATTCTTGCTCCAGC -3′ 宝酒造社製部位特異的変異法キットMutan-K を用 いて、pTB3のYa酵素のアミノ酸配列を変え ずに塩基配列を改変し、EcoR I 部位を消失させ たプラスミドpTB3Eを取得した。さらに下記

質転換体の中から第8図に示すプラスミドpUB 8 1 を保持する菌株を取得した。 p T B 3 E 5 μgをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタ ノール沈澱を行なった後、クレノウフラグメント (宝酒造社製)を用いてDNA末端を平滑化した。 さらにフェノール抽出、エタノール沈澱を行い、 このうち O. 2 μg と S ph I リンカー (ニューイン グランドバイオラブ社製) 5 0 ngをライゲーショ ンキットを用いて連結した。この反応物をハナハ ンの方法を用いて大腸菌JM109株に導入した。 生育した形質転換体のうちSphI認識部位が新た に作製されたプラスミドゥTB3ES (第8図) を保持する菌株を取得した。pTB3ES 50 μgをSphlで消化し、DEAEペーパー法を用 いて4.6 Kbp のDNA断片を回収した。このDNA 断片 O. O 5 μgと、Sph I で消化し、フェノール 抽出、エタノール沈澱を行なったpUB81 O. 2 µgとをライゲーションキットを用いて連結 した。この反応物をプロトプラスト法を用いてバ チルス・サチルス1012株に導入した。生育し

た形質転換体のうち第8回に示すプラスミド pl8 8 Yを保持する菌株を取得した。

pTA1B50μgをEcoRI及びBcl!で消化し、DEAEペーパー法を用いて約1KbpのDNA断片を回収した。pTB3EB1μgをEcoRI及びBcl!で消化した。pTB3EB1μgをPTB3EB1μgをPTB3EB1μgをPTB3EB1μgをPTB3EB1μgをPTB3EB1μgをPTB3EB1μgをPTB3EB1μgをPTB4に増した。このpTA1B由来の1KbpDNA断片0.05μgのpTA1B由来の1KbpDNA断片0.05μgをPTB4に増した形質転換体の方法に増して大陽的の方法に増して大陽的方法に増した形質をPTB4に表別をPTB

pAY1 50μgをSphI、さらにベクター側のフラグメントを分断するためXmnIで消化し、DEAEペーパー法を用いて約3.5 KbのDNA断片を回収した。pUB81 1μgをSphIで消化してルカリフォスファターゼで脱燐酸後、フェノール抽出、エタノール洗穀を行ない回収した。

を遊離させる酵素量を1アルカリプロテアーゼ単位(APU)とした。各培養上清のアルカリプロテアーゼ活性の結果を表ー1に示す。pUB8Yを保持する形質転換体のアルカリプロテアーゼの生産量は、pUB110を保持する形質転換体に比べて約3倍高く、またpUB8Aを保持する形質転換体は、pUB8Yを保持する形質転換体に比べて約30倍の高いYa酵素の生産性を示した。

このうち C. 2 μg と前述した p A Y 1 由来の 3. 5 Kb D N A 断片 O. 0 5 μg をライゲーションキットを用いて連結した。この反応物を、プロトブラスト 益を用いてバチルス・サチルス 1 0 1 2 株に導入した。生育した形質転換体のうち第 9 圏に示すプラスミド p U B 8 A を保持する菌株を取得した。

### Ya酵素の発現

Biochem. 45, 188 (1958)) に準じて 測定した。すなわち35℃、pH10.5の条件下で 10分間反応し、1分間にチロシン1μ8相当量

	1
	ı
7X	

				·
				APU/ml
Bacillus	subtilis	1012	(pUB8Y)	850
			(pUB8A)	25400
			(pUB110)	320

### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、Ya群素遺伝子の構造遺伝子領域の 塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第2図は、Ya酵素遺伝子のうち構造遺伝子の N末端側及びプロモーター領域を保持するプラス ミドpYT101の制限酵素切断地図である。

第3図は、Ya酵素遺伝子のうち構造遺伝子C 末端側及びターミネーター領域を保持するプラス ミドpYB2の制限酵素切断地図である。

第4回は、Ya群素遺伝子のうち構造遺伝子中 央部を保持するプラスミドpYX1の制限酵素切

### 特問平4-197182(9)

断地図である。

第5回は、バチルス・ライベンボルミスL8890? より単離したアミラーゼ遺伝子を保持するプラス ミドゥTA1の制限酵素切断地図である。

第6回は、バチルス・ライヘンホルミスL88907 より単離したナミラーゼ遺伝子のプロモーター領 域近時の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸 配列である。

第7回は、pYT101とpYB2のYa酵素 遺伝子の領域を連結したプラスミドpTB3の作 製行程図である。

第8回は、pTB3のうちYa酵素遺伝子の領 域をバチルス属細菌で複製可能なプラスミド pUB110に連結したプラスミドpUB8Yの 作製行程図である。

第9回は、pTB3EBのYa酵素遺伝子のプ ロモーター領域をpTA1Bのアミラーゼ遺伝子 のプロモーター領域に交換し、バテルス属細菌で 複製可能なプラスミドpUB110に連結したプ ラスミドpUB8Aの作製行程図である。

Ba: Bam H I Bc: Bcl I Egil I Εg C . Clai E : EcoR I H : Hinc I I · K pn I P :- Pst I K X b . X ba I S Sphi

AP:アルカリフェスフェターゼ MCS:マルチクローニングサイト Ap「:アンピシリン耐性遺伝子 Tc「:テトラサイクリン耐性遺伝子

ori:複製領域。

Xm: Xmol

### 性基配列とアミノ階配列 (その1) 网子酵素遗伝子

関面の浄地

GGATCCAGTACATTTTGGGTAAAGTGTCTAGGCGTTGTTTGT
1
TIGTTTTAAACTAATTGTCATTGTTTTTGGGAAAATAGGAGGAAAAAGCATTGGTATAGG
65
AATGTAATAGACTGAATTTTCCCAATACCGGAAGAGGTTTCTCCTATGCTATGTTATTAATGAATG
131
SI
MetlysGlyLysLysArgValValLeuSerValValAiaSerAla
AAGATGAGGAGTTGAGGAGAAATGAAGGGGAAAAAAAGAGTAGT
197 262
16
AfalicLeudlaSerValHetValSerSerProThrSerGlyAladspPheGlnValAsnPheAsn
GCGATCTTAGCGTCAGTTATGGTTAGTTCACCAACTAGTGGGGCAGATTTTCAAGTGAATTTTAAT
263 328
38 59
GlyVallysSerleuGluAsnAlaSerleuVallysProlleSerSerGlyGluAlaSerPheleu
CGTGTGAAAAGTTTAGAAAATGCTAGTTTGGTTAAACCGATAAGTAGCGGTGAGGCATCGTTTCTA
329
09
ValAspIhrGluAsnileAsnileProLysGlylleGInLysLysLeuGluAlaValGInLysAsp
GTAGATACGGAAAATATTAATATTCCTAAAGGTATTCAAAAGAAGCTAGAAGCAGTACAGAAGGAT
395
82 103
AsnGluLeuTyrlleValGlnPheThrGlyProlleSerGluGluGluGlukrgLysGlyLeuGluSer
AACGAACTCTACATCGTACAATTTACTGGACCAATTTCAGAGGAAGAGGGAAAAGGATTAGAGTCT
461 526
104
LeuGlyValSerlleLeuAspTyrValProAspTyrAlaPheileValGlnTyrSerGlyAlaThr
CTAGGAGTATCGATTCTAGATTATGTTCCAGATTATGCTTTTATTGTTCAGTATAGTGGTGCTACA
527 592
126
LyskanlleSerThrLeuHisSerValGluksnValGlnProPheLeuProLeuTyrLyslleksp
AAAAATATAAGTACTTTACATTCTGTTGAGAACGTACAACGATTTTTACCATTATAAAATTGAT
593 658

禁

### 図画の学品

### 第 【 図字算票道伝子 塩基配列 と アミノ酸配列(その3)

368	
SerGlyThr11eSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAla11eThrVa1GlyAlaThrGluAsnTyr	
TCAGGAACAATTAGTGCTCCAGGTACAGCGAAAAATGCTATTACGGTCGGCGCAAGGGAAAACTAT	
1319	
390	
ArgProSerPheGlySerlleAlaAspAsnProAsnNislleAlaGlnPheSerSerArgGlyAla	
CGCCAAGCTTCGGTTCGATAGCAGATAACCCAAATCATATTGGACAATTTTGATGAGAGGAGGT	
1385	
412	
ThraceampolyarelleLysProaspyalThraleProGlyThrPhelleLeuSerAlaareSer	
ACGAGGGATGGACGAATTAAGGGTGAGGTAACAGTCGTGGAAGATTTATTT	
1451	
440 455	
SerLeudlaProdspSerSerPheTrpAladsnTyrdsnSerLysTyrdlaTyrNetGlyGlyThr	
TCCTTAGGTCCAGAGTCTTCGTTTTGGGGGAATTATAAGAGTAAATAGGGGTATATGGGGGG	
1487	
456	
SerMetalaThrProlleValAlaGlyAsnValAlaGinLeuArgGluNisPhelleLysAsnArg	
TCCATGGCGACACCTATTGTTGCAGGGAATGTCGCGCAATTACGTGAGCATTTTATAAAAAATAGA	
1583	
66)	
GlylleThrProlysProSerLeulleLysAlaAlaLeulleAlaGlyAlaThrAspYalGlyLeu	
GGTATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAGCTGCACTTATCGCTGGTGCTACTGATGTTGGTTTA	
1714	
521	
GlyTyrProSerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgYalThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyr	
GGATATCCTAGTGGTGACCAAGGCTGGGGGGGTGTTACTCTAGATAAATTGTTAAATGTAGGGTAT	
1780	
522 543	
YaldsnGludlaThrdlateudlaThrGlyGlnLysdlaThrTyrSerlYheGlndlaGlndlaGly	
GTCAATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGACAAAAGGAAAGGAATGTATTGGTTGCAAGGAGGAGGAGG	
18481	
\$95	
LysProLeuLys11eSerLeuVa11rpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSerTyrThrLeu	
AAACCTITAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGGTCCTCGGAAGTACAACTGCATCTTATACACTA	
1847	
566	
YalAsnAspLeuAspLeuVallleThrAlaProAsnGlyGinLysTyrValGlyAsnAspPheSer	
GITAATGATTTAGATCTAGTTATTACTGCTCGGAATGGAGAAAATATGTAGGAAATGATTTAGT	
1913	

### 図面の浄典

### 第 【 関子隊累遣伝子 塩基配列 と アミノ隊配列(その2)

=======================================	169
ProGluLeuLeuThrLysGlyAlaSerGInLeuValGinAlaVallIeLeuAsnThrLysHisGlu	,
CCTGAGCTTTTAACGAAAGGTGCTTCCCAGCTTGTTCAAGGGGTTATTTTAAATACAAAACAGAA	-
659	124
170	=
AsnlysAsnHellysPheThrGlyLeuAspGlulleValGInTyrAlaAlaAsnAsnAspYalleu	, ,
AATAAAAACATGAAATTTACGGGTTTAGATGAGATGGTTCAATATGCTGCAAATAATGATGTGGGTT	-
124	790
192	213
TyrileSerProLysProGluTyrGluLeuMelAsnAspValAlmArgGlylleValLysAlmAsp	۵
TATATATCACCAAAGCCCGAGTATGAGCTAATGAATGATGTAGCAAGAGGGATAGTAAAAGCTGAT	-
791	856
214	235
ValAlaGinAsnAsnTyrGiyLeuTyrGiyGinGiyGinLeuValAlaValAlaAspThrGiyLeu	,
GTTGCACAAAACAATTACGGATTATATGGACAAGGTCAACTAGTTGCAGTAGGGGGACACAGGCTTA	~
857	823
238 2	151
AspīhrGiyĀrgĀsnĀspSerSerMelWisGluĀlsPheĀrgGiylysileīhrĀlslenīyrāls	-
GATACAGGTCGTAACGATAGTTCTATGCATGAAGCATTCCGGGGAAAATCACAGCTCTTTAGGGG	ی
923	886
258	279
LeugiyargihrasnasnainSerasnProasnGiyNisGiyihrNisYniAinGiySerYnileu	,
TIAGGAAGAACIAATAATGCGAGTGATCCGAATGGGCATGGCACACATGTAGCAGGTGGTGGCAGGTTGTGTACTT	-
988	-
280	301
GlydsndlaleudsnlysglydetdlaProGlndladsnleuValPheGlnSerlledetdspSer	Ļ
GGTAATGCTTTAAATAAAGGAATGGCTCGGCAAGCTAACTTAGTCTTCCAATCTATTATGGATAGG	پ
1055	1125
302	323
SerGleGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnIhrLeuPhrSerGlnAlaTrpksnAlaGly	<u>~</u>
AGGGAGGATTAGGTGGCTTACCATCGAACTTAAATACGTTATTTAGTCAAGCTTGGAATGCTGGA	4
1136	1186
324	345
AlakrølleilisThrksnSerTrpGlyklaProValksnGlyklaTyrThrklaksnSerkræGln	_
GCAAGAATTCATACTAACTCTTGGGGAGCCCCAGTAAATGGAGGGTACACTGCTAACTCGAGAAA	=
1187	152
346	367
ValdspūluīyrValdrgdsndsndspHelThrValLeuPhedladlaGlydsnGluGlyProdsn	5
GIGGATGAGTATGTTGGAAATAATGATAYGAGGTACTTTTTGGAGGTGGTAGTGAAGGTGTAAT	=
1253	90

Хь

2.0

16

図面の冷含

図Y酵素遺伝子 塩基配列 と アミノ降配列 (その4)

筑

TyrProTyrAspAsnAsnTrpAspG1yAr&AsnAsnValG1uAsnValPhelleAsnAlaProG1n

TATCCTTATGATAATAACTGGGATGGTCGCAACAATGTTGAGAACGTATTTATAAACGCTCCGGAA 1979

2044

2110 631 SerGlyThrTyrllefleGluValGlnAlaTyrAsnValProSerGlyProGlnArgPheSerLeu TCTGGAACGTATATAATTGAGGTTCAAGCGTATAATGTACCATCTGGCCCACAGGGTTTCTCACTA

2045

635

GCTATGGTACATTAATATTTTTTTAAATGAGAAAAAGTAAGGATTTTGACGTTAUTTTTGTCA TTTTGTTCAACGATTATATTTTTTTCCACGACTATGGAAGCTA AlalleValils 2111

EL

(A)

(E) C Xb E Ва 1-1

Ba

E.

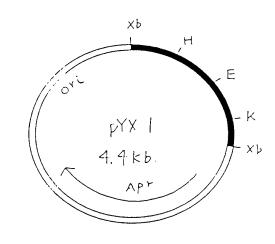
101

Ħ 2 3

1.0

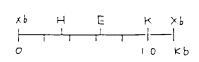
Ε Хь Ва (A) pYB2 S Ba

(A)



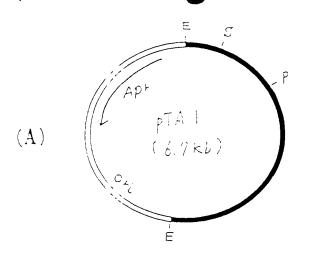
(B)

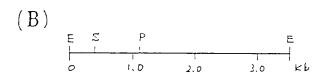
XI Bg E I SE -H 1.0 2.0 Kb (B)



3 W X

4 绑 Ø

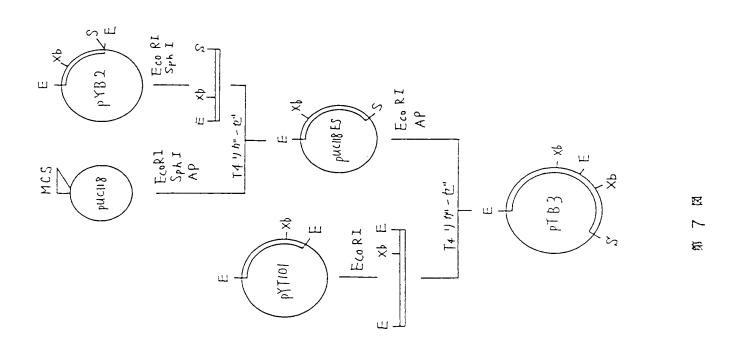


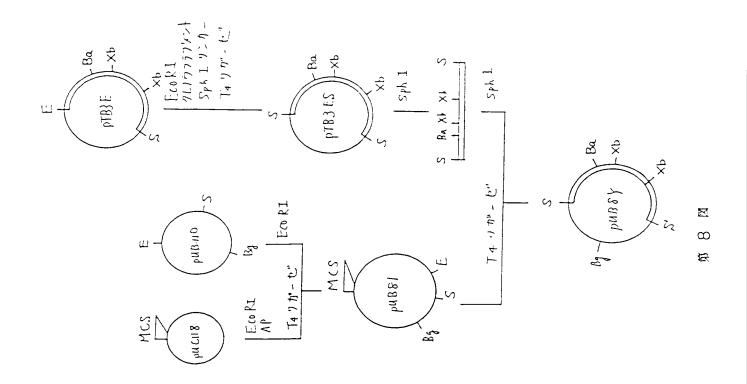


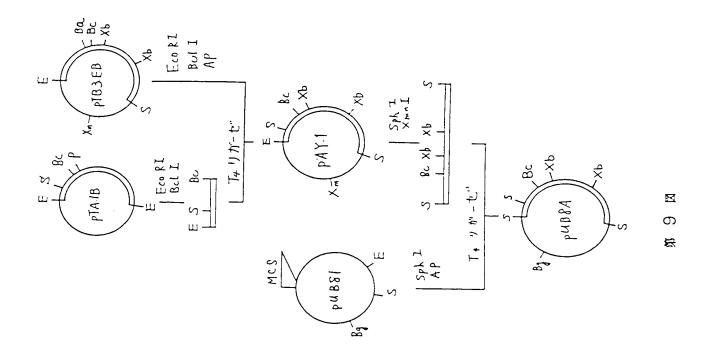
### 第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

CAACGTCGCAGATGCTGCTGAAGAGATTATTAAAAAGGTGAAAGGCAAAAGGCTATCAATT GAAAGCGCCATATCGCTTTTCTTTTGGAAGAAAATATAGGGAAAATGGTATTTGTTAAAA 180 2 MetLys ATTCTGAATATTTATACAATATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAATCATGAAA 240 3 GinGinLysArgLysTyrAiaArgLeuLeuProleuLeuPheAlaLeuIIePheLeuLeu CAACAAAAACGGCTTTACGCCCGATTGCTGCCGCTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTG 34 37 ProllisSerAla CCTCATTCTCCA 301 312

9T 5 🖾







手 統 補 正 書 (原式) 3-4-24 平成 3. 8. 27 月

逐

特許庁長官 植松

1.事件の表示 平成2年特許願第327110号

アルカリプロデアーゼYa酵素をコードするDNA及び該DNAを 用いたアルカリプロデアーセYa の製造方法 2. 発明の名称

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名 称 (676) ライオン株式会社

4. 代 理 人

東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号電話 (代) 3211-8741

名 (5995) 弁理士 中

5. 補正命令の日付

平成3年3月12日

6. 補正の対象



7. 補正の内容

図面の第1図<del>の(そので)、</del> を別紙の通り補正する。

(1) 明細書の以下の箇所を以下の通り補正する。

頁	ন	誤	正
6	下 # 5 4	計算	生産
11	10	<b>柴色体菌</b>	杂色体
15	下 16 2	Subtilis	subtilis
16	12	コーンスティ ーブリカー	コーンスティー ンプリカー
21	下から4~3	プロネンシー クエンサー	プロティンシー クエンサー

(2) 図面の第1図 <del>(4の2)、第1図 (4の1)</del>、 第6図及び第9図を別紙の通り補正する。

蚿 特許庁長官 枋

平成2年特許顯第327110号 1.事件の表示

アルカリプロテアーゼヤ a 酵素を コードする D N A 及び該 D N A を 用いたアルカリプロテアーセ Y a の製造方法 2. 発明の名称

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

> (676) ライオン株式会社 名 称

4. 代 理 人

東京都千代田区丸の内3丁目3番1号電話(代)3211-8741

村 氏 名(5995) 弁理士

自 5. 補正命令の日付

明細書の発明の詳細な説明の概 6. 補正の対象

(H)

7. 補正の内容





1318

1253

# 第 【 図Y酵素遺伝子 塩基配列 とフミノ酸配列(その2)

148

169

	601
ProGluLeuLeuThrLysGly,	ProCluteuteuThrLysGlyAlaSerGInteuValGInAlaVallieteuAsnThrLysIlisGlu
CCTGAGCTTTTAACGAAAGGT	CCTGAGCTTTTAACGAAAGGIGCTTCCCAGCTTGTTCAAGCGGTTATTTAAATACAAAACACAA
629	724
170	: 16 <b>1</b>
AsnLysAsnHetLysPheThr	AsnlysAsnlellysPheThrGlyLeuAspGlu leValGlnTyrAlaAlaAsnAsnAspValLeu
ΑΑΤΑΑΑΑΚΑΤΘΆΑΑΤΤΙΑΘΟ	aataaaakcatgaaatitaccggtttagatgagatcgttcaatatgctccaaataatgatgctt
724	067
192	213
TyrlleSerProLysProGlu	TyrileSerProLysProGluTyrGluLeuHetAsnAspYa!AlaArgGlylleValLysAlaAsp
TATATATCACCAAAGCCCGAG	TATATATCACCAAAGCCCGAGTATGAGCTAATGAATGATGTAGCAAGAGGGGATAGTAAAAGCTGAT
191	856
214	235
ValAlaGinAsnAsnTyrGiyl	ValAlaGInAsnAsnTyrGIyLeuTyrGIyGInGIyGInLeuValAlaAsaIAlaAspThrGIyLeu
GTTGCACAAAACAATTACGGAI	GTTGCACAAAACAATTACGGATTATAGGACAAGGTCAACTAGTTGCAGTAGCGGACACAGGCTTA
857	922
236	257
AspThrGIyArgAsnAspSer§	ASPThrG1yArgAsnAspSerSerHetH1sG1uA1aPheArgG1yLys11eThrA1aLeuTyrA1a
GATACAGGTCGTAACGATAGTI	GATACAGGTCGTAACGATAGTTCTATGCATGAAGCATTCCGCGGAAAATCACAGCTCTTTAGGCG
923	886
258	279
LeuGlyárgThrásnásnálaS	LeuGlydrgThrdsndsndlaSerdspProdsnGlyHlsGlyThrHisYaldlaGlySerValLeu
TTAGGAAGAACTAATAATGCGA	ttaggaagaactaataatgcgagtgatccgaatgggcatggcacacatgtagcaggttctgtactt
989	1054
280	108
GlyAsnAlaLeuAsnLysGlyN	GIyAsnAIaLeuAsnLysGIyHetAIaProGInAIaAsnLeuVaiPheGInSerIIeHetAspSer
GGTAATGCTTTAAATAAAGGAA	GGTAATGCTTTAAATAAAGGAAJGGCTCCGCAAGCTAACTTAGICTTCCAATCTATTATGGATAGC
1055	1125
302	323
SerGlyGlyLeuGlyGlyLeuP	SerGIsGIsLeuGisGIsLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGinAlaTrp4snAlaGIs
AGCGGAGGATTAGGTGGCTTAC	A CC GCA GCATTA GGT G CCTTA CCAT GCAA CTTAAA TA CGTTATTA GT CAA CCTT GGAA T GCT GGA
1126	9811
324	345
AlakrgileHisThr4snSerT	AlaArgileHisThr4snSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyrThrAlaAsnSerArgGln
GCAAGAATTCATACTAACTCTT	GCAAGA4TTCATACTAACTCTTGGGGAGCCCCAGTAAATGGAGCGTACACTGCTAACTGGAGAA
1187	1252
346	196
ValAspGluTyrValArgAsnA	ValAspGluTyrValArgAsnAsnAspHelThrValLeuPheAla4laGlyAsnGluGlyProAsn
GTGGATGAGTATGTTCGAAATA	GTGGATGAGTATGTTCGAAATAATGATATGACGGTACTTTTTGCAGCTGGTAATGAAGGTGCTAAT

# 第 | 図7酵素遺伝子 塩基配列とフミノ酸配列 (その十)

GGATCCAGTACATTTGGGTAAAGTGTCTAGGCGTTGTTTGT	AATGGGTTTTTT
64 TTGTTTTAAACTAATTGTCATTCTTTTTCCATTCCCAAAATTACCAGG	64
65	CATTCGTATAGC
AATGTAATAGACTGAATTITCCCAATACCGGAAGAGGTITCTCCTATGCTATG	I SU TATTAATGAATG
131	196
	15
HetLysGiyLysLysLysRvalValLeuServalValAlaSerAla AAGATGAGGAGTTGAGGAGAAATGAAGGGGAAAAAAAAA	ValAlaSerAla
197	1160110001
16	707
Alalict.cuAlaSerValHetValSerSerProThrSerGlyAlaAspPheGlnValAsnPheAsn	ValAsnPheAsn
GCGATCTTAGGGTCAGTTATGGTTAGTTCACCAAGTAGTGGGGGGATTTTGAAGTGAATTTTAAT	GIGAATTTTAAT
263	328
38	59
GlyValLysSerLeuGluAsnAlaSerLeuValLysProlleSerSerGlyGluAlaSerPheLeu	AlaSerPheleu
GGTGTGAAAAGTTTAGAAAATGCTAGTTTGGTTAAACCGATAAGTAGCGGTGAGGCATCGTTTCTA	GCATCCITTCTA
329	394
09	81
ValAspThrGluAsn11eAsn11eProLysG1y11eG1nLysLysLeuG1uA1aVa1G1nLysAsp	ValGint.ysAsp
GTAGATACGGAAAATATTAATATICCTAAAGGTATTCAAAAGAAGTAGCTAGAAGCAGTACAGAAGGAT	GTACAGAAGGAT
395	460
82	103
AsnGluleuTyr11eValGlnPheThrGlyProlleSerGluGluGluArglysGlyl cuGluSer	41yl cuGluSer
ANGGAALGIAGATUNTALATTACTGGACGAATTTCAGAGGAAGGGAAAAGGATTAGAGTU 461	GGATTAGAGTUT
	526
	125
LeuciyyaləefileLeuxspTyrValProxspTyrAlaPhelleValcInTyrSercilyAlaThr	SertiyataThr
CTAGGAGIA I GATT CTAGATTATGTT CCAGATTATGCTTTTATTGTT GAGTATAGTGGTAGA	AGTGGTGCTACA
175	592
126	147
LysAsni LeSerThrLeullisSerVa IGTuAsnVa TGTnProPhcLeuProLeuTyrt yst LeAsp	fyrtystle4sp
AAAAATATAAGTACTTTACATTGTGTTGAGAAGGTAGAAGATTTTTAGGATTATAAAAATTGAT	ATAAATTGAT
593	859

富基配列 と アミノ酸配列 (その4)	609
274	
図 Y 酵繁遺伝子	
掀	
	588

TATCCITATGATAATAACTGGGATGGTCGCAACAATGTTGAGAACGTATITATAAACGCTCCGGAA 1979 610 82046 610 82047 FCTGGAACGTATATAATTGAGGTTCAAGCGTATAATGTACATGTGGCCCACAGCGTTTCTCCCTA 2045 632 632 633 ALALIEVALHIS GCTATCGTACATTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	TyrPro	TyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAsnValPhelleAsnAlaProGln
994 610 SerGiyThrTyrileTleGluValGlnAlaTyrAsnValProSerGiyProGlnArgPheSerLev TCTGGAACGTATATAATTGAGGTTCAAGCGTATATGTACCATCTGGCCCACAGCGTTTCTCACTA 2045 632 632 AlaileValHis GCTATCGTACATTATATTTTTAAATGAGAAAAACTAAGGATTTTCAGTTTTTTTT	TATCCT	TATGATAATAACTGGGATGGTCGCAACAATGTTGAGAACGTATTTATAAACGCTCCGCAA
610 SerCiyThrTyrilelleGluValGlnAlaTyrAsnValProSerCiyProGlnArgPheSerLeu TCTGGAACGTATATAATTGAGGTTCAAGGGTATAATGTACCATGTGGCCCACAGGGTTTCTCACTA 2045 632 632 AlaileValHis GCTATCGTACATTATATTTTTTAAATGAGAAAAACTAAGGATTTTCAGCTTTTTTTCTCAT 2110 2111 2111 2117	1979	2044
SerCIyThrTyriteIleGluValGinAlaTyrAsnValProSerCIyProGlnArgPheSerLeu TCTGGAACGTATATAATTGAGGTTCAAGGGTATAATGTACCATCTGGCCCACAGGGTTTCTCACTA 2045 632 632 635 AlaileValHis GCTATCGTACATTAATATTTTTTAAATGAGAAAAAACTAAGGATTTTCAGGTTTTTTCTCAT 2111 2111 2176	019	631
TCTGGACGTATATAATTGAGGTTCAAGGGTATAATGTACCATCTGGCCCACAGGGTTTCTCACTA 2045 632 635 Alailevalhis GCTATCGTACATTAATATTTTTTAAATGAGAAAAACTAAGGATTTTCAGGTTTTTTTT	SerGly	ThrTyr11e11eGluVa1G1nA1aTyrAsnVa1ProSerG1yProG1nArgPheSerLeu
2010 632 632 Alailevalhis GCTATCGTACATTATATTTTTTAAATGAGAAAAACTAAGGATTTTCAGCTTATTTTCCAT 2111 2111 2117	TCTGGA	ACGTATATATTGAGGTTCAAGCGTATAATGTACCATGTGGCCCACAGGGTTTCTCACTA
632 635 ALALIEVA INIS GCTATCGTACATTAATATTTTTTAAATGAGAAAAAACTAAGGATTTTCAGGTTAGTTTTTCTCAT 2111 TTTGTTCAACGATTATATTTTTTCCACGACTATGGAAGCTA 2176	2045	2110
AIATIEVAIHIS GCTATCGTACATTAATATTITTTAAATGAGAAAAACTAAGGATTTTCACCTTAGTTTTTCTCAT 2111 TTTGTTCAACGATTATATTTTTTCCACGACTATGGAAGCTA	632	635
GCTATCGTACATTAATATTTTTAAATGAGAAAAACTAAGGATTTTCAGCTTAGTTTTTCCAT 2111 TTTGTTCAACGATTATATTTTTTCCACGACTATGGAAGCTA 2177	Alalle	ValHis
ITCAACGATTATATTTTTTCCACGACTATGGAAGCTA	CCTATC	GTACATTAATATTTTTAAATGAGAAAAACTAAGGATTTTCACGTTAGTTTTTCTCAT
TTTGTTCAACGATTATATTTTTTCCACGACTATGGAAGCTA 2177	2111	2176
7,112	111611	CAACGATTATATTTTTTCCACGACTATGGAAGCTA
	2177	

## 第 6 図フミラーゼ・プロモーター遺伝子の信箋配列

CAACGI	CAACGTCGCAGATGCTGCTGAAGAGATTATTAAAAAGCTGAAAGGAAAAGGCTATCAATT
_	09
CCTAAC	GGTAACTGTATCTCAGCTTGAAGA4GTGAAGAGCAGAGAGGCTATTGAATAAATGAGTA
19	120
CAAAGC	GAAAGCGCCATATCGCTTTTCTTTTGGAAGAAATATACGGAAAATCGTATTTGTTAAAA
121	081
	1 2
	HelLys
ATTCTG	ATTCTGAATATTTATACAATATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAATCATGAAA
18	240
e	33
Clucla	GinGintysArgtysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuilePheLeuLeu
CAACAA	CAACAAAAACGGCTTTACGCCCGATTGCTGCCGCTGTTATTTGCGGCTCATCTTGTTGCTG
241	300
34	37
ProHis	ProHisSerAla
CCTCAT	CCICATICICCA

# 第 【 図Y酵素遺伝子 塩基配列 と アミノ酸配列(その3)

SericythrileSeralaProciythralatysasaniaitethraiciyatathrichuksniyr TCAGGAACATTAGTGCTCCAGGTACAGCGAAAATGCTTTAGGTGGGGGGAACGGAAACCTA  1319  411  412  412  413  413  414  417  418  418  418  419  419  410  411  411  411  411  411		`;
GGAACANTTAGTGCTCCAGGTACACGAAAATGCTATTACAGTGCACCCAACGCAAAA BGAACANTTAGTGCTCCAGGTACACGCAAAATGCTATTACAGTCGCCCCAACGCAAAA BTOSE PHEGIYSET ITEALASPASHP TAASHHISTIEATAGTGCTCCCCCCAACGCAAAG BCCCAACCTTCGGTTCCATAGCCTAACCCCAATTATACACATTTTCATCCACCACGC BCCCAACCTTCGGTTCCATAGCCTAACCCCAATTATACACATTTTTTTT	308	389
GGAAGAATTAGTGGTGCAGGTACAGGGAAAATGGTATTAGGTGGGGGGAAGGGAAAA BFPÓSEPHEGIYSETTEATAAGGTAAAGGGAAAATGATTAGGAATTTTGATGAGAAGG SCAAGGTTGGGTTGGATAGGAAAAGGTGAATATTGCAGAATTTTGATGAGAAGG SCAAGGTGGATGAAGAGAAAAGGTGAAGAGTTTATTTTTTTT	SerGlyThr11eSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlalleThrValGlyAlaThrGlu	AsnIyr
Prober Phediy Serite Alads pas no final strateging he Serie and Garage Ser Mediy Serite Alads pas no final serite Alads and control pas no final serite Alads pas no final serite Alads and control pas no final serite Alads pas no final serite Alads and control pas no final serite Alads no final serite Alads and for final serite	TCACGAACAATTAGTGCTCCAGGTACAGCGAAAAATGCTATTAGGGTGGGGGAAGGGAA	AACTAI
FroSerPheGlySerlleAlaAspAsnProAsnHistleAlaGlnPheSerSerArgGly CA4CCTTCGCTTCGCTACCAAAACCCAAATCAATTGCACAATTTTCATCGACAGG S ArgAspClyArglieLysProAsnValThrAlaProGlyThrPheLieLeuSerAlaArg ArgAspClyArglieLysProAsnValThrAlaProGlyThrPheLieLeuSerAlaArg ArgAspClyArglieLysProAsnValThrAlaProGlyThrPheLieLeuSerAlaArg ArgAspClyArgliaAcGTGACGTAACGTCCTCGAAGATTTATTTTATTTTATCAGGGGG  IELAIaThrProLysProSerSerPheTraAlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrHetGlyGly ATTACTCCTAACCTTTGTGCAGGAATGTGGCCAATTACGTGAGGATTTATTT	9161	1207
ProŠerPheGlySerileAlaAspAsnProAsnHisileAlaGinPheSerSerArgGly  CCA4GCTTCGGTTCGATAGCATAACCCAAATCAATTGCACAATTTTCATCCAGGG  ArgAspGlyArgileLysProAspValThrAlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArg  ArgAspGlyArgileLysProAspValThrAlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArg  LeuAlaProAspSerSerPheTrpAlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrHetGlyGly  TTAGCTCCAGCTCTTCGTTTTGCGCGAATTATAACAGTAAATACCGGAATTGGGCGG  HetAlaThrProAspSerSerPheTrpAlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrHetGlyGly  THAGCTCCAGCTCTTCGTTTTGGGCGAATTATAACAGTAAATACGGGAGCATTTAAAAAAA  HetAlaThrProAspFroSerLeutleLysAlaAlaAcuttaGaAATACGGGAGCTATTTAAAAAAA  ATTAGTCCTAAGCCTGTTTTAATAAAAGCTGGCGAATTACGTGAGCTATTGGTGGGGAAATGTGGGGGAGCGGGGGGGG	330	1384
CCAGCCTTCCCTTCCTTCCTTCATASSASSIFTOASINISTICATICCTATTTCATCCACACACACACCACCACCACCACCACCAC	a land of the land	=
Arakapulituan ituan katakah manceaan terata terata terata dara sebagai dara sebagai terata katakah mancea menana dara sebagai terata berata menana me	n 61 USCTTTTCHYSPELIEA TAASPASMPTOASMHISTTEA TAGTMPHESETSETAT8	Glyala
Arbandiuding and the first and the first and the first and the first and the following of the first and th	- GUCUMANGU I EGGI I EGGI AGLAGATAAE CAAATEATT GEAGAATTI TEATE GAGA I 1985	COACCI
ArbaspelyarglielysProAspValThrAlaProGlyThrPhelleleuSerAlaAra AGGGAIGGAGGAATTAGGCGGAACGCTCCTGGAGGTTTTTTTTTT	200	1450
AGGATGCACGACTTATTATATATATATATATTATTATTATTATTATTATT	71,	439
400GATGGAGGAATTAAAGCCTGAGGTAACAGCTCCTGGAACATTTATTT	INFAFBASPGIYAFBIIELYSProAspYaIThFALaProGlyThrFhelleLeuSerAla	Ar &Ser
1  LEUALABPEOASPSETSETPHETTPALAASNTYTASNSETLYSTYTALATYTHEIGLYGLY  THAGCICCACACTCITCGTTTTGGGCGAATTATAACAGTAAATACCCGTATATGGCGGG  THAGCICCACACTCITCGTTTTGGCGCAATTATAACAGTAATGCCGTATATGGCGGG  THEIALAINTPROLYSPROSETLEUTIELYSALAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	ACGAGGGATGGACGAATTAAGGGTGACGTAACAGGTCCTGGAAGATTTATTT	CHICI
LEUALIAPTOASPSETSETPHETTPALAASNTYTASNSETLYSTYTALIATYTHEIGLYGUS  THACCICCACACTCTTCGTTTTGGCCGAATTATACAGTAAATGCCGTATATGGCCGG  THE LALIATHTPTOLIEVALALIAGTYASNYALAIAGTGCTCATATGCCGTATTTATAAAAAAT  THE LALIATHTPTOLIEVALALIAGTYASNYALAIAGTGCTCATTATGGTCATTTATAAAAAAT  THE THIT PROLYSP TO SETLE ULITELY SALAA AALE ULI EALIAGTYA AATTATAAAAAATTGGTGCCACTTTATTATAAAAAATTGGTGGCGAGCCTGTTATGCCGAGCATTATGCGTGGTGCTACTGATGTGGGTGAGTGGCGAGCTGATATGGCGGCGTGTTATGCGTGGTGGCTACTGATGGTGGGGAGCTGTTATGGCGGGCG	1451	1516
LeudiaProissysperserPhotrpalaasniyrasniserLystyralatyrhetGtyGt TTAGCTCCAGACTCTTCGTTTTGGGCGAATTATAACAGTAAATACGCGCATATGGGCGCGT TTAGCTCCAGACTCTTCGTTTTGGGCGAATTATAACAGTAAATACGCGATATGGCGGG THE LALAThrProiseValaiaGlyAsnValaiaGlnLeudrgCjuliispheileLysasnatG ATGGCGACACCTATTGTTGCAGGGAATGTCGCCCATTAGGTGAGCATTTTATAAAAAA ATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGGCTGGTGCTACTGATGTTGG BYTRCTCGTAGGCGTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGGCTGGTGCTACTGATGTTGG BYTRCTAGGCGTGCGCGCGCGCGCGTTATGGCTGGTGCTACTGATGTTGG AATGAAGCAACTGCAAAAAGCAAAAAAGCAAAAAAGCAAAATGCTTAATAGTAGCT AATGAAGCAACTGCATTAGCCAGAAAAAAGCAAAAGCAAAATGCTTATAGATAATGTTAGGTAATAGTAAATGTTATAGAAATGTTATAGAAAATGATTAGAAAATGATATAGAAAAAGCAAAAAGCAAAAAGAAAAAGAAAATGAAATAGTAAAAAAAA	440	455
TTAGCTCCAGACTCTTCGTTTTGGGCGAATTATAACAGTAAATACGCGTATAGGGGGGT  THE LALATHEF TO LEVALALAGINGS NVALALAGING LEUARGGINHIS PHETLELYS ASSAMELA LA L	SerLeudlaProdspSerSerPheTrpdladsnTyrdsnSerLysTyrdlaTyrHe1G1y1	StyThr
19 14 TAILAITHEFOLLEVALALAGIYASANYALALAGINLEUATAGIUHISPHELLESASSA ATGGCGAGGCATTGTTGCAGGGAATGTCGCGCAATTACGTGAGCATTTTATAAAAAAA 3 3 41 TACTGCAAGCCTTGTTTAATAAAAGCTGCACTTATGGCTGGTGCTACTGATGTTGG 9 42 TACTCCTAAGCCTTGTTTAATAAAAGCTGCACTTATGGCTGGTGCTACTGATGTTGG 9 48 ASTGLUALATHEALEUALATHEGLYATBAAAGCTGCACTTATGGCTGGTGCTACTGATGTTGG 5 5 6 7 7 7 7 7 85 ASTACTGAGTGCTGCGCGCGCGTGTTAGTGCTTATGCTTGCT	TCCTTAGCTCCAGACTCTTCGTTTTGGGCGAATTATAAGAGTAAATACGGGTATATGGG	SGIACC
HE TAI BTHIFT OF LEVALATED LYSING I ALGORING EGOLING SPILE TELYS ASSAMANA AND CONTRACT CACCACT TATA AND AND AND CONTRACT CONTRACT CACCACT TATA AND AND AND CONTRACT C	1487	1582
SerietalaThirfrollevalAlaGlyAshValaIaGlnLeudrgGlutlisPhelleLysAshArg 1583 1648 478 478 478 67141eThirfroLysProSerLeutleLysAlaalaLeutleAlaGlyAlaThirdspyalGlyLeu 6GATTACTCCTAACCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGCTGGTGCTGTGTTGTTTA 1649 61y11eThirfroLysProSerLeutleLysAlaalaLeutleAlaGlyAlaThirdspyalGlyLeu 6GATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGCTGGTGGTTGTTTA 1649 520 6ATATCCTAGCGTGCAGCGGGGGGGGGTTACTCTGAGAAATCGTGATGTTGGTTTA 1780 522 843 843 844 565 1786 544 846 565 1787 1881 1887 887 8887 8887 8887 8887	456	477
TCCATGCCGACACCTATGTTGCAGGCAATGTGGCGCATTAGGTGAGCATTTATAAAAAATAGA 1583 478 478 478 61911eThrProLysProSerLeutieLysAtaAtaLeutieAtaGtyAtaThrAspVatGtyLeu GGTATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGCTGCTGCTGCTGCTGTTGTTGCTTTA 1649 500 6474 500 6474TACTCCTAGCCGCCGCGCGCGCTGTATGCTGCTGCTGCTGCTGTTGTTTA 1714 500 6474 1715 522 543 ValAsnGluAtaThrAtaLeuAtaThrGtyGthLysAtaThrTyrSerThcGthAtaGthAtaTyr GGATATCCTAGTGGTGACCACAGGACAAAAGCAAAATGCTTAATGCTTAAATGTAGCTAT 1786 544 565 LysProLeuLys11eSerLeuValTrpThrAspAtaProGtySerThrThrAtaSerTyrThrteu AACCTTTAAAAATCTGGTTAGCACAGAAGATGCTGCAGCAACTGTATAGATA 1847 1847 1847 1847 1847 1847 1913	SerMelAlaThrProlleValAlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGlullisPhelleLys.	ASDAFR
1583 478 GIYLLETHYP COLYSP COSET LEUT I ELYSALDALALEU I LEALDGIYALDTHYASPVALGIYLEU GGIATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGCCTGGTGCTACTGATGTTGGTTTA 1649 500 GIYTYP POSECGIYASPGING LYTPGTYARGYA I THI LEUASPLYSSET LEUASHVALATATY GGATATCCTAGTGGTGACGAAGCCTGGGGGGGTTACTCTAAATGTAAATGTAATGTATTY 1715 522 VALASNGLUATATHA TALEUALATHYGLYGINLYSALDTHYTYSE THGCHALAGGGATATTTA 1716 524 VALASNGLUATATHA TALEUALATHYGLYGINLYSALDTHYTYSE THGCHALAGGGATATGTATGTATAGGGGTTATTAGGGTATTTAGGGTATTAGGGGATATGTATAGGGGTATTAGGGGTATTAGGGTATTAGGGGTATTAGGTATTAGGTAGGTAGGATTAGGTAGAATGATTAGGTAGATTAGGTAGAATGATTAGGTAGAAAATGATTAGGTAGAATGAATGATTAGGTAGAATGAATGATTAGGTAGAATGAATGAATGATTAGATAGAATGA	TCCATGGCGACACCTATTGTTGCAGGGAATG1CGCGCAATTACGTGAGCATTTATAAAA	AATAGA
HETHYProLysProSerLeutieLysAlaAtaLeutieAtaGiyataThrAspValGiy  ATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGCTGGTGCTACTGATGTTGG  B  FYPROSErGIyASpGInGIYTPGIYARBVAIThrLeuAspLysSerLeuAshValAta  ANTCAAGTGGTGACCAAGCGTGGGCGTTACTGTAAAATGGTTAGGTAAA  ANTCAAGTGGTGACCAAGCGTGGTAAAAAGCAAAAAGGAAAAATGGTTAAAAGAAAAGCAAGGTATTCCTTAATASerTyrTh  CCTTTAAAAATCTGGTAGGACGACAAAAAGGAAGGAAGGA	1583	1648
IIEThrProLysProSerLeulieLysAiaAiaLeulieaiaGiyAiaThrAspvaiGiyaTATACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGCTGGTGCTACIGATGTTGGTGGTGGTACIGATGTTGGTGGTGGTACTCTAAGCTGCACTTATGCTGGTGCTACIGATGTTGGTGGTGGTACTCCTAAGCTGCTACTCGTAAATGCTTAATAATGTAGGTGGTAGGTA	478	499
ATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATGCCTGGTGCTACTGATGTTGG  9  1yrProSerGyAspGtnG1yTrpG1yArgValThrteuAsptysSerteuAsnValAt.  1ATCCTAGTGGTGACCAAGCCTGGGGCCTGTTACTCTAGATAATGGTAAGTGTAGG  5  ANTGAAGCAACTGCATTAGCCACAGAAAAAGCAAAAGTATTCGTTCCATGCAAGTAGTATT  1  ProLeuLyst1eSerteuValTrpThrAspAlaProG1ySerThrThrAtaSerTyrTh  650458pLeuAspteuAspteuValTrpThrAspAlaProG1ySerThrThrAtaSerTyrTh  ANTGAAAATGTGGTAGGACAGATGGTCCTGGAAGTACAACTGCATTATAGTA  ASNASpteuAspteuAspteuValtieThrAtaProAsnGtyGtntysTyrValG1yAsnAspPha  ANTGATTTAGATCTAGTATTACTGCTCCGAATGGACAAAAATTGTAGCAAAATGATTTT  1  1  1  1  1  1  1  1  1  1  1  1	GlylleThrProLysProSerLeulieLysAlaAlaLeulleAlaGlyAlaThrAspVal	ClyLeu
9  TyrProSerGyAspGinGlyTrpGiyArgVaiThrEeuAspLysSerLeuAshVaiAi.  TATCCTAGTGGTGAGCCAAGGCTGGGGGGGTGTTACTCTAGATAAATGGTAAATGTAGG  S  AATGAAGCAACTGCATTAGCCAGGAGAAAAAGGAAGGTATTCGTTCCATGAAAGGAAAGG  I  CCTTTAAAAATGTCGTTAGGACAGAAAAAGGAAGGTATTCGTTCCAGGACAAAGGT  ASnASpLeuAspLeuVaitTrpThrAspAiaProGiySerThrThrAiaSerTyrTh  ASnASpLeuAspLeuVaitTeThrAiaProAsnGiyGiniysTyrVaiGiyAsnAspPha  AATGATTAGATCTGGTATGGACAGATGGTCCTGGAAGTACAAGTGGAGTATTAG  7  AATGATTTAGATCTAGTTATTAGTGCTCCGGAAAAATATGTAGGAAAAATTTTAGAGAAAATTTTAGAGAAAATTTTAGAGAAAAAA	GGTATTACTCCTAAGCCTTCTTTAATAAAAGCTGCACTTATCGCTGGTGCTACTGATGTT	V11133
TyrfroSerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAl. TATCCTAGTGGTGACCAGGGGGGGGGTTACTCTAGATAAATGGTAAATGTAGGAS S ASpGluAlaThrAlateuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerThGCIAALaGTAAL AATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGAAAAAGGAAGGTATTCGTTCCATGGACAAGGACAAGGAAGG	1649	1714
TyrProSerGlydspClnGlyTrpGlydrgValThrEeudspLysSerLeudshValdt. TATCCTAGTGGTGAGCAGGCGGGGGGGGTTACTCTAGATAAATGCTTAAATGTAGGGGGGGG	200	521
TATCCTAGTGGTGACCAAGGCTGGGGGGGTGTTACTCTAGATAAATGGTAAATGTAGG S  AATGAAGGAACTGCATTAGCCACAGAAAAAGGAAGGTATTCGTTCCAAGGACAAGG Proleulysi leSerleuva itrpThraspalaproGtySerThrThrataSerTyrTh CCTTTAAAAATGTGGTAGGACAGATGGTGCTGGAAGTAAATGAATG	GłyTyrProSerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrteuAsptysSerleuAsnVal	Alalyr
S  ASTGAAGCAACTGCATTAGCCAGGACAAAAGGAAGGTATTCGTTCCAGGGACAAGGT  ATGAAGGAACTGCATTAGCCAGGACAAAAAGGAAGGTATTCGTTCCAGGGACAAGGT  ProLeuLystleSerLeuVatTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSerTyrTh  ASTAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGGTCCTGGAAGTACAACTGGATTAGTAAGA  ASTASpLeuAspLeuVattieThrAlaProAstGlyGlntysTyrValGlyAstAspPha  AATGATTTAGATCTAGTATTACTGCTCGGAATGGACAAAAATGTAGAGAAATGATTTT  1  33	GGATATCCTAGTGGTGACCAAGGCTGGGGGGGTGTTACTCTAGATAAATGGTTAAATGTA	CCCIAI
ASTGAAGEAATTAGEAATATAGIYGINLYSALATATTTGTTGCTTGCAAGGAGAATGAATGAAGAGGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA	1715	1780
ASNG UAJAThrAlateuAlaThrClyGinLysAlaThrTyrSerincGinalaCinali AATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGACAAAAGCAAGGTATTGCITCCAAGGACAGAGGG I ProLeuLys I LeSerLeuVa I TrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSerTyrThr CCTTTAAAAATGTGGTAGGACAGATGCTCGGAAGTACAAGTGGATGTTAGG ASnASpLeuAspLeuVa I LeThrAlaProAsnGlyGlnlysTyrValGlyAsnAspFhGAATGATTAGGAAGATGATTTTAGGAASpCTAGAATGATTTTAGGAASpCTAGAATTAGAAATGATTTTAGAAATGATTTTAGAAATGATTTTAGAAATGATTTTAGAAATGATTTTAGAAATGATTTTAGAAATGATTTTAGAATGAATTTAGAAAATATGAAGAA	522	543
AATGAAGCAACTGCATTAGCCACGAGCAAAAAGGAAGGTATTGGTTGCAAGGACAAGG Proleulysteserleuvattrptbraspalaproglyseithrthratasertyrthi CCTITAAAAATGTGGTAGGACAGATGGTGCTGGAAGTACAAGTGCATGTTATAG AshaspleuaspleuvatttetbrataproashGtyGtniysTyrVatGtyAshAspfhg AATGATTTAGATGTAGTTATTAGTGCTGGGACAAAAATATGTAGGAAAATGATTTT	ValAsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGInLysAlaThrTyrSerItheGlnAlaGIn	AlaGly
I ProLeuLysTLeSerLeuValTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSerTyrThr CCTTTAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGCTCCTGGAAGTACAACTGCATCTTATAG 7 AsnAspLeuAspLeuValtTeThrAlaProAshGlyGlnlysTyrValGlyAsnAspPhc 1 3	GTCAATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGGAAAAAGGAAGG	159755
ProLeulystieSerleuVaiTrpThraspAlaProGlySerThrThrataSerTyrThr CCTTTAAAAATCTCGTTAGTATGGACACATGCTCCTGGAAGTACAACTGCATCTTATACA 7 AsnAspleuAspleuVaitteThrataProAsnGlyGIntysTyrVaiCiyAsnAspPhr <sup>2</sup> AATGATTTAGATCTAGTTATTACTGCTCCGAATGGAAAAATATGTAGAAATATTTT	1781	1846
LysProleulysileSerLeuvaiTrpThraspalaProGlySerThrThralaSerTyrThrteu AAACCTTAAAAATCTCGTTAGTATGCACAGTGCTCCTGGAAGTACACAGTGTTATACAGTA 1847 566 ValAsnAspleuAspleuVailieThrAlaProAsnGlyGlntystyrVaiGlyAsnAspPheSer GTTAATGATTTAGATCTAGTTATAGTGCTCCCAATGGACAAAAATGTAGATTTTAGT	544	595
AAACCTITAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGCTCGGAAGTACAACTGGATGTTATAGAGTA 1847 1912 566 587 ValdsondspleudspleuvalijeThralaProdsoGiyGiniysTyrValGiyAsondspPheSer GTTAATGATTTAGATCTAGTTATTAGTGCCTCGGAAAAAAATGTAGGAAAATGATTTAGT	LysPruleulys1leSerLeuValTrpThrAspAlaProG1ySerThrThrAlaSerTyr	Ihrteu
7 AsnAspleuAspleuVa IIIeThrA1aProAsnGIyGIntysTyrVaIGIyAsnAspPh AATGATTTAGATCTAGTTATTACTGCTCCGAATGGAAAAAATATGTAGGAAATGATTT 1	AAACCIIIAAAAAICICGIIAGIAIGGACACAIGCICCIGGAAGIACAACIGGAICIIAI	ACACTA
ASNASpLeuAspLeuVailleThrAlaProAsnGlyGInlysTyrValGlyAsnAspPhe AATCATTIAGATCTAGTTA11ACTGCTCCGAATGGACAAAAA1ATGIAGGAAATGTGI 19	1847	1912
ValdsndspleudspleuVallieThrdIaProdsnGlyGlnlysTyrValGlydsndspPheSer GTTAATGATTTAGATCTAGTTATTAGTGCTCGGAATGGAGAAAATATGTAGGAAAATGATTTAGT 1913	909	587
GTIAATGATITAGATCTAGTTATTACTGCTCCGAATGGACAAAAATATGTAGGAAATGATTTAGT 1913	ValdsndspleudspleuVallleThrdlaProdsnGlyGlndysTyrValGlydsndspi	PheSer
	GTIAATGATTIAGATCTAGTTATTACTGCTCGGAATGGAGAAAAATATGTAGGAAATGT	HIAGI
	1913	1778

